

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 06-169758

(43)Date of publication of application : 21.06.1994

(51)Int.Cl.

C12N 1/20

C12P 13/00

//(C12N 1/20

C12R 1:01)

(C12P 13/00

C12R 1:01)

(21)Application number : 03-133470

(71)Applicant : COSMO

SOGO

KENKYUSHO:KK

(22)Date of filing :

09.05.1991

(72)Inventor : WATANABE KEITARO

TANAKA TORU

HOTTA YASUSHI

(30)Priority

Priority number : 02271361 Priority date : 09.10.1990 Priority country : JP

(54) MICROORGANISM AND PRODUCTION OF 5-AMINOLEVULINIC ACID

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain a microorganism, having weak 5-aminolevulinic acid dehydratase activity and capable of producing the 5-aminolevulinic acid even under both anaerobic bright and aerobic dark conditions and a method for producing the 5-aminolevulinic acid under the anaerobic bright or the aerobic dark conditions using the microorganism,

its resting microbial cell or enzyme without adding a 5-aminolevulinic acid dehydratase inhibitor thereto.

CONSTITUTION: This microorganism is obtained by subjecting a photosynthetic bacterium such as Rhodobacter sphaeroides to the mutation treatment and capable of producing 5-aminolevulinic acid under both anaerobic bright and aerobic dark conditions and has weak 5-aminolevulinic acid dehydratase activity. This microorganism, its resting microbial cell or enzyme is used to produce the 5-aminolevulinic acid in high yield at a low cost by adding a small amount of a 5-aminolevulinic acid dehydratase inhibitor or without addition thereof under the anaerobic bright or the aerobic dark conditions which are set conditions of the existing equipment.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

* NOTICES *

Japan Patent Office is not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.**** shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

CLAIMS

[Claim(s)]

[Claim 1] 5-aminolevulinic acid production bacillus obtained by carrying out variation processing of the photosynthetic bacterium.

[Claim 2] A photosynthetic bacterium is load-bar KUTA. 5-aminolevulinic acid production bacillus according to claim 1 characterized by being SEFAROIDESU.

[Claim 3] The claim 1, 5-aminolevulinic acid production bacillus of two publications which are characterized by ****ing to the Fermentation Research Institute, the Agency of Industrial Science and Technology, as Fermentation Research Institute **** No. (FERM P-11752) 11752.

[Claim 4] The manufacture method of 5-aminolevulinic acid characterized by making 5-aminolevulinic acid production bacillus cultivate under existence of a glycine and a succinic acid.

[Claim 5] The manufacture method of 5-aminolevulinic acid characterized by contacting the pause biomass of 5-aminolevulinic acid production bacillus, or the enzyme of the biomass origin to a glycine and a succinic acid.

[Claim 6] The manufacture method of a claim 4 and 5-aminolevulinic acid five publications characterized by 5-aminolevulinic acid production bacillus being 5-aminolevulinic acid production bacillus according to claim 1 to 3.

[Translation done.]

* NOTICES *

Japan Patent Office is not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.**** shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Industrial Application] this invention relates to the method of manufacturing 5-aminolevulinic acid by high yield also under an aerobic dark condition, from the first under aversion Ming conditions, without adding the matter which checks the activity of 5-aminolevulinic acid dehydratase with the enzyme of 5-aminolevulinic acid production bacillus and 5-aminolevulinic acid production bacillus, its pause biomass, or its biomass origin.

[0002]

[Description of the Prior Art] 5-aminolevulinic acid is a compound which has played the important role in a living organism as a precursor of a tetrapyrrole compound. it is the natural compound which has the outstanding property which will be said if this 5-aminolevulinic acid shows the effect which was excellent as a herbicide and an insecticide, moreover does not show toxicity to men and beasts, and it does not have a residual property to environment, either, since resolvability is high (refer to the patent application official announcement No. 502814 [61 to], and JP,2-138201,A) However, practicality is missing this natural 5-aminolevulinic acid having high cost, and using it as a herbicide or an insecticide (29 Chemical Week/October, 1984). many chemosynthesis methods are considered in such the present condition -- **** (for example, refer to JP,2-111747,A) -- still sufficient method is not developed

[0003] On the other hand, the manufacture method of 5-aminolevulinic acid using microorganisms, such as a photosynthetic bacterium, is also considered (references, such as JP,2-92293,A and a Japanese-Patent-Application-No. No. 307216 [one to] specification). In a living organism, dyad condenses 5-aminolevulinic acid by 5-aminolevulinic acid dehydratase, it serves as a porphobilinogen, is reacted consecutively, and is metabolized to various kinds of tetrapyrrole compounds.

[0004] By the way, generally the above-mentioned 5-aminolevulinic acid dehydratase is a strong enzyme, and in order that it may make 5-aminolevulinic acid in a living organism usually react promptly, it is rare. [of 5-aminolevulinic acid being accumulated in a living organism] In order to store up this 5-aminolevulinic acid, it is necessary to weaken the activity of 5-aminolevulinic acid dehydratase. The method of generally adding the activity inhibitor of 5-aminolevulinic acid dehydratase represented by the levulinic acid as this technique is learned (also by the manufacture method of

5-aminolevulinic acid using above-mentioned JP,2-92293,A or the microorganism of Japanese Patent Application No. No. 307216 [one to], the levulinic acid is used as an activity inhibitor of 5-aminolevulinic acid dehydratase). By this method, the cost of activity inhibitors, such as a levulinic acid to add, needs to separate this 5-aminolevulinic acid and these activity inhibitor after accumulation of 5-aminolevulinic acid this top.

[0005] On the other hand, if a photosynthetic bacterium is cultivated by the aerobic dark condition, it will not generate 5-aminolevulinic acid. On the other hand, the present practical fermentation facility is set as cultivation of an aerobic dark condition. Therefore, in the manufacturing technology of 5-aminolevulinic acid which uses a photosynthetic bacterium, the existing fermentation facility could not be used, but reconstruction of a new facility or the existing facility was needed, and the rise of the manufacturing cost of 5-aminolevulinic acid was inevitable.

[0006] this invention is producing [in / aversion Ming conditions or an aerobic dark condition / 5-aminolevulinic acid dehydratase activity is weak, and] 5-aminolevulinic acid moreover in consideration of the above many points. It aims at proposing the manufacture method of the high yield which cannot require addition of the activity inhibitor of proposing 5-aminolevulinic acid production bacillus to cut and 5-aminolevulinic acid dehydratase, and can perform aerobic either aversion Ming conditions or a dark condition, and 5-aminolevulinic acid of a low cost.

[0007]

[Means for Solving the Problem] In order that this invention persons may attain the above-mentioned purpose, as a result of repeating research, although (1) photosynthetic bacterium was mutated, to inside This strain is strain with 5-aminolevulinic acid dehydratase activity there are some which show growth weak [at the minimal medium] growth and strong at the minimal medium which added the porphobilinogen, and weak, Moreover, although the photosynthetic bacterium was mutated, if it checks to inside that the strain which produces 5-aminolevulinic acid in an aerobic dark condition exists and the strain of (2) above is further used for it very little addition [without adding 5-aminolevulinic acid dehydratase activity inhibitor] -- moreover, even if it uses the existing fermentation facility set as the aerobic dark condition, it checks that 5-aminolevulinic acid can be manufactured by high yield, and it came to develop this invention

[0008] That is, 5-aminolevulinic acid production bacillus of this invention is characterized by carrying out variation processing of the photosynthetic bacterium, and being obtained. Moreover, 5-aminolevulinic acid production bacillus of this invention is

for example, load-bar KUTA as a photosynthetic bacterium which is an old stock. SEFAROIDESU (*Rhodobacter sphaeroides*) is used. Furthermore, 5-aminolevulinic acid production bacillus of this invention is the strain which can produce 5-aminolevulinic acid on the weak strain and aerobic dark condition, or aversion Ming conditions of 5-aminolevulinic acid dehydratase activity, and what was deposited with the Fermentation Research Institute, the Agency of Industrial Science and Technology, as Fermentation Research Institute **** No. (FERM P-11752) 11752 is mentioned as the example. A bacteria stock is an example of the variant which has the two above-mentioned properties simultaneously. The manufacture method of 5-aminolevulinic acid of this invention is characterized by making 5-aminolevulinic acid production bacillus cultivate under aversion Ming conditions or an aerobic dark condition under existence of a glycine and a succinic acid. Moreover, the manufacture method of 5-aminolevulinic acid of this invention is characterized not only by the thing of the growth system of the above-mentioned 5-aminolevulinic acid production bacillus but by contacting the pause biomass of 5-aminolevulinic acid production bacillus, or the enzyme of the biomass origin to a glycine and a succinic acid. Furthermore, 5-aminolevulinic acid production bacillus used for the manufacture method of 5-aminolevulinic acid of this invention is characterized by being 5-aminolevulinic acid production bacillus of this invention described above, for example.

[0009] Hereafter, the detail of the manufacture method of 5-aminolevulinic acid production bacillus of this invention and 5-aminolevulinic acid is explained. first, load-bar KUTA whose 5-aminolevulinic acid production bacillus of this invention is a photosynthetic bacterium the inversion to the porphobilinogen of 5-aminolevulinic acid which used SEFAROIDESU as the old stock, and it is varied and obtained, and 5-aminolevulinic acid dehydratase activity was weak as mentioned above, and produced this from the glycine and the succinic acid -- **** -- it supposes that it is small and a lot of 5-aminolevulinic acid is accumulated in culture medium Moreover, 5-aminolevulinic acid production bacillus of this invention can also be cultivated on aversion Ming conditions, and can be cultivated also by the aerobic dark condition. The detail of the separation method of 5-aminolevulinic acid production bacillus of this invention of having such a property is illustrated below.

[0010] A component required for multiplication of the above-mentioned old stock is poured distributively in a test tube, after sterilizing, an old stock is inoculated and stationary culture is carried out to the bottom of optical irradiation. Variation operation is performed after the buffer solution washes this culture medium. As this variation operation, the usual variation technique is employable. For example, an old stock is

cultivated in the buffer solution which irradiated physical variation fields, such as ultraviolet rays and ionizing radiation, at the old stock on an agar medium, or added chemical mutagens, such as base analogs, such as alkylating agents, such as an ethyl methane sulfonate (EMS) and N-methyl-N'-nitroglycerine-N-nitrosoguanidine (NTG) and an ethyl oximido urea (ENU), and a bromodeoxyuridine (BrdUrd), or there is a method of using biological variation fields, such as a transposon mutation method. After varying the above-mentioned old stock by such variation technique, the buffer solution washes further, and it scatters and cultivates to an agar medium etc.

[0011] or [that the minimal medium shows weak growth by isolating the colony obtained by the above-mentioned operation in order to obtain strain with weak dehydratase activity efficiently] -- or it cannot grow at all but can choose by checking that strong growth is shown by the culture medium which added the porphobilinogen. Moreover, in order to choose the stock which accumulates a lot of 5-aminolevulinic acid into culture medium also by the aerobic dark condition, a variant can be cultivated by the aerobic dark condition and it can choose by measuring 5-aminolevulinic acid in a culture medium. In addition, although the property of above both can also be acquired by one variation, it can vary to a variant only with one of properties further, and both properties can also be given to it.

[0012] In the case of the old stock before variation, the case of the variant after variation is easy to be the same, and a general culture-medium component or the component usually used for cultivation of a photosynthetic bacterium is added by the culture medium used for such separation / variation operation besides carbon sources, such as glutamic acid, a malic acid, an acetic acid, a pyruvic acid, a lactic acid, a succinic acid, a fumaric acid, a tartaric acid, a gluconic acid, ethanol, a glycerol, a glucose, a fructose, a mannitol, a sorbitol, and a yeast extract. As a general culture-medium component, organic nitrogen sources, such as inorganic-nitrogen compounds, such as ammonia, an ammonium chloride, ammonium phosphate, an ammonium sulfate, an ammonium carbonate, an ammonium acetate, an ammonium nitrate, a sodium nitrate, and a urea, and a yeast extract, dry yeast, a peptone, a meat extract, corn steep liquor, a KAZAMINO acid, can be used as a nitrogen source. Moreover, as mineral, each salts, such as a potassium, sodium, iron, magnesium, manganese, copper, calcium, and cobalt, etc. can be used.

[0013] Moreover, in order to remove metals which exist for example, in a culture medium, such as iron and cobalt, as a component usually used for cultivation of a photosynthetic bacterium and to promote generation of 5-aminolevulinic acid, especially the thing for which a chelating agent is added is desirable. As this chelating agent, an

ethylene-diamine-tetraacetic acid, cyclohexanediamine tetrapod acetic-acid, glycol-ether diamine tetrapod acetic-acid, diethylenetriaminepentaacetic-acid, triethylenetetramine hexa acetic-acid, nitrilotriacetic-acid, alpha, and alpha'-dipyridyl etc. is mentioned, for example. Especially the addition to the culture medium of these chelating agents has desirable 1 - 4 mmol/l about one to 10 mmol/l to the whole culture medium. If there are too few additions, metals, such as iron and cobalt, are unremovable enough, and if there are too many additions, it will become prevention of 5-aminolevulinic acid generation. Any of continuous or intermittent addition are sufficient as the addition method. Furthermore, as a culture condition, in the case of an old stock, an old stock and a variant may have the desirable bottom of the optical irradiation anaerobic conditions of about 0.5 to 50 Klux during pH about five to 8 temperature of about 15-45 degrees C, and about one - ten days of time, and when it is a variant, you may be under the same optical irradiation anaerobic conditions as the case of an old stock, or an aerobic dark condition.

[0014] CR-17 which are an example of the strain obtained by the above-mentioned separation / variation operation have strong growth in the culture medium which had the almost same mycology-property as an old stock, and growth was weak and added the porphobilinogen in the porphobilinogen additive-free minimal medium. And in the culture medium by which a glycine and a succinic acid are added and 5-aminolevulinic acid dehydratase activity inhibitor is not added, under an aversion Ming condition or an aerobic dark condition, 5-aminolevulinic acid is generated and it accumulates so much. This CR-17 stock is deposited with the Fermentation Research Institute, the Agency of Industrial Science and Technology, [the Fermentation Research Institute bacillus deposition No. (FERM P-11752) 11752].

[0015] Next, the detail of the manufacture method of 5-aminolevulinic acid of this invention is explained. Not only 5-aminolevulinic acid production bacillus of this invention represented with this invention method by the above-mentioned CR-17 stock but what is obtained by other creation methods, the thing obtained considering other bacilli as an old stock, and 5-aminolevulinic acid dehydratase activity obtained by the other separation methods are weak, and 5-aminolevulinic acid production bacillus which produces 5-aminolevulinic acid by aversion Ming conditions or the aerobic dark condition can be used. In addition, in an aerobic dark condition, not only strain with weak 5-aminolevulinic acid dehydratase activity but the strain this activity of whose is usually a grade can be used. 5-aminolevulinic acid can be manufactured by making these 5-aminolevulinic acid production bacilli cultivate under the bottom of existence of a glycine and a succinic acid, aversion Ming conditions, or an aerobic dark condition, or

contacting the pause biomass of these biomasses, or the enzyme of the biomass origin to a glycine and a succinic acid.

[0016] Hereafter, the manufacture method of 5-aminolevulinic acid using CR-17 stock is explained. The same culture medium as the case where the above-mentioned CR-17 stock is separated is used, and it cultivates by the same culture condition. At this time, in order to strengthen growth, you may add a porphobilinogen. Moreover, cultivation time can be shortened, if it cultivates by the complex medium which added the yeast extract etc. and what carried out the harvest is used. Furthermore, more high-concentration 5-aminolevulinic acid is generable by keeping pH of culture medium constant within the limits of 5-8 using HCl solution or NaOH solution. Moreover, if it adds simultaneously with the cultivation start of CR-17 stock, since a CR-17 stock proliferation rate will become slow, as for a glycine and a succinic acid, it is desirable to add, when [a certain] grade multiplication is carried out. In any [of a glycine and a succinic acid] case, especially the addition of about 15 to 45 mmol/l is desirable about ten to 80 mmol/l to the whole culture medium. Moreover, although whole-quantity addition may be carried out at once, you may add the addition method continuously or intermittently.

[0017] Moreover, the activity inhibitor of 5-aminolevulinic acid dehydratase of CR-17 can also be added at this time. It can compare with the addition in the case of the manufacture method by the microorganism of conventional 5-aminolevulinic acid, **** small quantity is sufficient as this addition, for example, when using a levulinic acid as this inhibitor, it is about 1/3 amount of the conventional initial complement, and can obtain the yield of 5-aminolevulinic acid of the same grade as the former. In addition, you may add small quantity (the amount of said) every at a fixed interval from the time of the cultivation start of CR-17 (at or the time of addition of a glycine and a succinic acid), and the addition method of this levulinic acid may add the whole quantity at the time of a cultivation start (at or the time of addition of a glycine and a succinic acid). Furthermore, after growth of a bacillus passes over the middle of a logarithmic growth phase, in addition, to add is good. At this time, it is good also as optical irradiation anaerobic conditions of about 0.5 to 50 Klux, or is good also as an aerobic dark condition which is the setups of the existing facility.

[0018] In order to manufacture 5-aminolevulinic acid as an enzyme of a pause biomass or the bacteria origin using the above-mentioned CR-17 stock, the same culture medium as the case of above-mentioned variation and separation is used first, and using as it is what was cultivated by the same culture condition, by centrifugal separation etc., cell separation is carried out and it uses. In addition, it can also be used, solutions', such as

a phosphate buffer's, washing the separated biomass and making this solution suspend it further. Moreover, as for the enzyme of the biomass origin, it is desirable to use what was refined by the conventional method. That is, after detaching the biomass debris obtained by, for example, carrying out crush processing of the above-mentioned suspension of a biomass by the ultrasonic wave, the French press, the high-pressure homogenizer, etc. by solid-liquid by centrifugal separation etc., what was used as the refining enzyme by general refining meanses, such as column refining and electrophoresis, is used. Furthermore, since its amount of enzymes per unit volume will increase if these pause biomasses and enzymes of the biomass origin are fixed, if what was fixed is used, they can react efficiently. This fixation can be performed by conventional methods, such as the alginic-acid calcium method, the polyacrylamide gel method, a polyurethane-resin method, and an optical bridge formation resin method.

[0019] If a glycine and a succinic acid are contacted in a phosphate buffer, a reaction will arise and 5-aminolevulinic acid will be manufactured by these pause biomasses and enzymes of the biomass origin. As for the reaction condition at this time, it is desirable to suppose that it is the same as that of the conditions in above-mentioned variation and separation of CR-17 stock. In addition, optical irradiation is unnecessary when using an enzyme. In this reaction, it is desirable as an energy source to add suitably electron donors, such as ATP (adenosine triphosphate), pal-P (pyridoxal phosphate), CoA (coenzyme A) and a methanol, ethanol, hydrogen, nicotinamide adenine dinucleotide (NAD), formaldehyde, and formic acid. In addition, also in this reaction, the activity inhibitor of 5-aminolevulinic acid dehydratase can be added.

[0020] 5-aminolevulinic acid in the culture medium obtained as mentioned above or reaction mixture can be refined by the conventional method. For example, it can collect by methods, such as solvent extraction, and the well-known refining methods, such as column chromatography, can also be suitably used together at this time.

[0021]

[Function] Since 5-aminolevulinic acid production bacillus of this invention has weak 5-aminolevulinic acid dehydratase activity, it cannot convert even into a porphobilinogen 5-aminolevulinic acid generated by operation of this production bacillus from a glycine and a succinic acid. For this reason, 5-aminolevulinic acid production bacillus of this invention makes the operation which accumulates 5-aminolevulinic acid so much in the culture medium of bacteria. Moreover, under an aversion Ming culture condition, since 5-aminolevulinic acid production bacillus of this invention has the operation which produces 5-aminolevulinic acid under an aerobic dark culture condition from the first, according to this strain, it accumulates

5-aminolevulinic acid also by the aerobic dark condition which is the setups of the existing fermentation facility.

[0022] Moreover, it is by the manufacture method of 5-aminolevulinic acid of this invention. 5-aminolevulinic acid production bacillus of this invention which makes the above operations is begun. 5-aminolevulinic acid production bacillus [in not only aversion Ming conditions but an aerobic dark condition] which can produce 5-aminolevulinic acid or these pause biomass with other weak or 5-aminolevulinic acid dehydratase activity, and the enzyme of the biomass origin are used. Only by adding a **** minute amount, though it adds separately like before, without adding the activity inhibitor of 5-aminolevulinic acid dehydratase in order to manufacture 5-aminolevulinic acid from a glycine and a succinic acid And 5-aminolevulinic acid can be manufactured by high yield and the low cost by aversion Ming conditions or the aerobic dark condition which is the setups of the existing fermentation facility.

[0023]

[Example]

The culture-medium component of the glutamate malate culture medium shown in example 1 table 1 was melted to 1l. of tap water, and the culture medium 1 was prepared. pH of a culture medium 1 was 6.8.

[0024]

[Table 1]

化 合 物	組成 (g/l)
グルタミン酸ナトリウム	3. 8
リンゴ酸	2. 7
KH_2PO_4	0. 5
K_2HPO_4	0. 5
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	0. 8
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0. 2
CaCl_2	$5. 3 \times 10^{-2}$
$\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	$1. 2 \times 10^{-3}$
ニコチン酸	$1. 0 \times 10^{-3}$
塩酸チアミン	$1. 0 \times 10^{-3}$
ビオチン	$1. 0 \times 10^{-5}$

[0025] 10ml of culture media 2 which added and prepared yeast-extract 2 g/l to the above-mentioned culture medium 1 was put into the test tube with an outer diameter of

21mm, they were sterilized for 15 minutes at 121 degrees C, and stationary culture of load-bar KUTA SEFAROIDESU (*Rhodobacter sphaeroides*) IFO12203 which is a photosynthetic bacterium was carried out for three days under optical irradiation of 1 loop **** splice, 30 degrees C, and 5Klux. 10ml of culture media 2 was poured distributively in another test tube, and it sterilized in it. The reciprocal shaking culture of the above-mentioned culture medium 1 was carried out to these culture media 2 by 3 loop **** splice, 30 degrees C, and 250rpm for 8 hours. At-long-intervals heart separation of this culture medium 2 was carried out for 30 seconds in 15,000rpm for washing, the supernatant liquid was thrown away, and the tris maleic-acid buffer (pH 6.0) was made to suspend so that it may become the culture medium 2 and the amount of said before centrifugal separation. This washing operation was repeated twice [further]. Then, at-long-intervals heart separation was again carried out for 30 seconds in 15,000rpm, the supernatant liquid was thrown away and gentle placement incubation of the solution in which the N-methyl-N'-nitroglycerine-N-nitrosoguanidine (NTG) which is a chemical mutagen was dissolved by 100microg [/ml] concentration was carried out for 80 minutes at the culture medium (before the 2nd centrifugal separation) 2 of a basis, equivalent ****, and 30 degrees C.

[0026] Thus, after washing the processed bacillus 1 3 times by the same method as the above, it was poured distributively in another test tube, was planted in the culture medium 2 which sterilized, was inherited, and carried out reciprocal shaking culture for two days by 30 degrees C and 250rpm. It scattered on the petri dish which sterilized the culture medium which added and prepared agar 17 g/l to the culture medium 2 for 15 minutes at 121 degrees C, and similarly sterilized, and the agar plate culture medium was prepared. The above-mentioned culture medium (culture medium of a bacillus 1) 3 was diluted and applied to this petri dish 1,000 times by the sterilized water, and it cultivated for four days at 30 degrees C. By the culture medium 1, growth sorted out the variant stock in which growth weak and strong against a culture medium 1 in culture-medium 1' which carried out 300micromol/l addition of the porphobilinogen is shown among the colonies obtained as mentioned above. It is load-bar KUTA in one of these variant stocks. SEFAROIDESU It was named CR-17.

[0027] After having planted variant stock CR-17 (Fermentation Research Institute **** No. 11752) obtained in the example 2 example 1 in the culture medium 1, inheriting it and cultivating for one day under optical irradiation of 30 degrees C and 5Klux, strain was washed 3 times by the same method as an example 1 by tris hydrochloric-acid BAHHAA (pH 8.1), and crude enzyme liquid was obtained by ultrasonic spallation. 5-aminolevulinic acid dehydratase (ALAD) activity of this crude enzyme liquid was

measured by Sato's and others method (447 J. Nutr.Sci.Vitaminol., 27,439- 1981). Each ALAD activity value is shown in Table 2 with the activity value of an old stock.

[0028]

[Table 2]

菌 株	ALAD活性値 (U/mg蛋白質)
親 株	24.8
CR-17	13.4

1U: 30℃, 1時間でポルフォビリノーゲンを1nmol

生成する酵素量

[0029] Variant stock CR-17 (Fermentation Research Institute **** No. 11752) obtained in the example 3 example 1 was inoculated into the culture medium 1, and was cultivated under optical irradiation of 30 degrees C and 5Klux for 24 hours. Subsequently, it added so that might become 30 mmol/l about a glycine and it might become 30 mmol/l about a succinic acid, and cultivation was continued for further 24 hours. When the fixed quantity of the 5-aminolevulinic acid in culture medium was carried out by the coloring method with a yell RIHHI reagent, 186micromol/l production of the 5-aminolevulinic acid was carried out.

[0030] Preliminary cultivation of the variant stock CR-17 (Fermentation Research Institute **** No. 11752) obtained in the example 4 example 1 was carried out for two days under optical irradiation of 30 degrees C and 5Klux by the culture medium 1. This was inoculated so that it might become 5-aminolevulinic acid production culture medium (glycine 60 mmol/l, succinic-acid 60 mmol/l, malic-acid 2.7 g/l, KH₂PO₄ 0.5 g/l, K₂HPO₄ 0.5 g/l, CaCl₂ 0.053 g/l, pH 6.8) with 2 g/l, and it was cultivated for two days under optical irradiation of 30 degrees C and 5Klux. Consequently, 522micromol/l production of the 5-aminolevulinic acid was carried out.

[0031] The same operation as an example 4 was performed except having started the production cultivation by the example 55-aminolevulinic acid production culture medium, having carried out 5 mmol/l addition of the levulinic acid after 5 mmol/l and the cultivation start on 5 mmol/l and the 2nd on the 1st at the time of a cultivation start, and having made incubation period into three days. Consequently, 8.2 mmol/l production of the 5-aminolevulinic acid was carried out.

[0032] After having planted variant stock CR-17 obtained in the example 6 example 1 in the culture medium 1, inheriting them and cultivating under optical irradiation of 30 degrees C and 5Klux on the 1st, strain was washed 3 times by the same method as an

example 1 with the tris hydrochloric-acid buffer, and the crude enzyme liquid of the amount of 0.88mg proteins per ml was obtained by ultrasonic spallation. To this, it added so that it might be set to ATP8.5 mmol/l, CoA-SH1 mmol/l, pyridoxal-phosphate 1 mmol/l, glycine 0.1mol/l., succinic-acid sodium 0.1 mol/l, magnesium chloride 10 mmol/l, tris hydrochloric-acid buffer 50 mmol/l, and glutathione 0.3g/l., and 37 degrees C incubated to it for 2 hours. Consequently, 824micromol/l production of the 5-aminolevulinic acid was carried out.

[0033] CR-17 and the old stock which were obtained in the example 7 example 1 were inoculated into the culture medium 1, it was under [of 30 degrees C] the dark condition, and as the amount of oxygen and levulin acidity were shown in Table 3, they were cultivated. 12 hours after the cultivation start, 30 mmol/l addition of 30 mmol/l and the succinic acid was carried out for the glycine. In addition, addition time of a levulinic acid was made into the 12-hour back of a cultivation start. The amount of 5-aminolevulinic acid generation at this time is shown in Table 3.

[0034]

[Table 3]

培養条件		5-アミノレブリン酸生成量 ($\mu\text{mol/l}$)	
培養方法	レブリン酸 (mmol/l)	親株	CR-17
好気暗	0	2	46
好気暗	15	18	108
強制通気暗	15	8	92

[0035] It turns out under an aerobic dark condition that variant stock CR-17 are generating 5-aminolevulinic acid in large quantities compared with an old stock so that clearly from Table 3.

[0036]

[Effect of the Invention] As explained in full detail above, 5-aminolevulinic acid production bacillus of this invention can create a photosynthetic bacterium by the easy operation as an old stock. Moreover, since the activity of 5-aminolevulinic acid dehydratase which can produce 5-aminolevulinic acid from a glycine and a succinic acid, moreover condenses dyad [of 5-aminolevulinic acid], and is converted into a porphobilinogen is weak according to the 5-aminolevulinic acid production bacillus of

this invention, a lot of 5-aminolevulinic acid can be accumulated in culture medium. Furthermore, according to the 5-aminolevulinic acid production bacillus of this invention, under aversion Ming conditions, 5-aminolevulinic acid is producible also by the aerobic dark condition from the first.

[0037] And according to the manufacture method of 5-aminolevulinic acid of this invention, the activity of a 5-aminolevulinic acid dehydratase like 5-aminolevulinic acid production bacillus of the above-mentioned this invention is weak, and it sets to the bottom of an aversion Ming condition, and any of an aerobic dark condition. The pause biomass of 5-aminolevulinic acid production bacillus which can produce ** 5-aminolevulinic acid, or this bacillus, and the enzyme of the biomass origin can be used, and 5-aminolevulinic acid can be manufactured by high yield from a glycine and a succinic acid.

[0038] According to the manufacture method of 5-aminolevulinic acid of this invention a certain sake, a manufacturing cost can be reduced by coming out enough by addition of a **** minute amount at this time, though addition of 5-aminolevulinic acid dehydratase activity inhibitor is unnecessary and it adds. And when not adding 5-aminolevulinic acid dehydratase activity inhibitor, after manufacture of 5-aminolevulinic acid, the partition stage of this 5-aminolevulinic acid and 5-aminolevulinic acid dehydratase activity inhibitor becomes unnecessary, and an installation cost not only decreases, but manufacture efficiency can improve sharply and it can reduce a manufacturing cost sharply. In addition, since manufacture of 5-aminolevulinic acid can be performed in an aerobic dark condition, industrial production of 5-aminolevulinic acid can be performed using the existing fermentation facility as it is, and sharp reduction of facility cost can be aimed at. Furthermore, according to the manufacture method of 5-aminolevulinic acid of this invention, since the above-mentioned 5-aminolevulinic acid production bacillus can be used by the growth system, at the time of a cultivation start, a lot of 5-aminolevulinic acid only by only using little 5-aminolevulinic acid production bacillus can be manufactured, and a manufacturing cost becomes still cheaper.

[Translation done.]

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-169758

(43)公開日 平成6年(1994)6月21日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 1/20	A	7236-4B		
C 1 2 P 13/00		8931-4B		
// (C 1 2 N 1/20				
C 1 2 R 1:01)				
(C 1 2 P 13/00				

審査請求 未請求 請求項の数 6(全 7 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平3-133470

(22)出願日 平成3年(1991)5月9日

(31)優先権主張番号 特願平2-271361

(32)優先日 平2(1990)10月9日

(33)優先権主張国 日本(JP)

特許法第30条第1項適用申請有り 平成2年11月14日
社団法人日本醗酵工学会開催の「平成2年度日本醗酵工
学会大会」において文書をもって発表

(71)出願人 000130189

株式会社コスモ総合研究所
東京都港区芝浦1丁目1番1号

(72)発明者 渡辺 圭太郎

埼玉県幸手市権現堂1134-2

(72)発明者 田中 徹

埼玉県幸手市東3丁目14番31号

(72)発明者 堀田 康司

埼玉県大宮市柳引町2丁目598番1号

(74)代理人 弁理士 久保田 千賀志 (外1名)

(54)【発明の名称】 微生物及び5-アミノレブリン酸の製造方法

(57)【要約】

【目的】5-アミノレブリン酸デヒドラターゼ活性が弱く、かつ嫌気明条件でも好気暗条件でも5-アミノレブリン酸の生産が可能な5-アミノレブリン酸生産菌と、該菌、その休止菌体又は酵素により、5-アミノレブリン酸デヒドラターゼ阻害剤を添加せず、かつ嫌気明条件又は好気暗条件での5-アミノレブリン酸の製造方法とを提供する。

【構成】ロドバクター セファロイデス等の光合成細菌を変異処理して得られる5-アミノレブリン酸生産菌であって、5-アミノレブリン酸デヒドラターゼ活性が弱く、嫌気明条件下でも、好気暗条件下でも5-アミノレブリン酸を生産することができる。この菌、その休止菌体又は酵素を使用し、5-アミノレブリン酸デヒドラターゼ阻害剤を添加せず又は少量の添加で、かつ嫌気明条件又は既存の醗酵設備の設定条件である好気暗条件で、高収率、低コストで5-アミノレブリン酸を製造する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 光合成細菌を変異処理して得られる5-アミノレブリン酸生産菌。

【請求項2】 光合成細菌がロドバクター セファロイデスであることを特徴とする請求項1記載の5-アミノレブリン酸生産菌。

【請求項3】 工業技術院微生物工業技術研究所に微工研寄第11752号(FERM P-11752)として寄託されたことを特徴とする請求項1、2記載の5-アミノレブリン酸生産菌。

【請求項4】 5-アミノレブリン酸生産菌を、グリシン及びコハク酸の存在下で培養させることを特徴とする5-アミノレブリン酸の製造方法。

【請求項5】 5-アミノレブリン酸生産菌の休止菌体又は菌体由来の酵素を、グリシン及びコハク酸と接触させることを特徴とする5-アミノレブリン酸の製造方法。

【請求項6】 5-アミノレブリン酸生産菌が請求項1～3記載の5-アミノレブリン酸生産菌であることを特徴とする請求項4、5記載の5-アミノレブリン酸の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、5-アミノレブリン酸生産菌、及び5-アミノレブリン酸生産菌、その休止菌体又はその菌体由来の酵素により5-アミノレブリン酸デヒドラターゼの活性を阻害する物質を添加することなく、かつ嫌気明条件下ではもとより、好気暗条件下でも高収率で5-アミノレブリン酸を製造する方法に関する。

【0002】

【従来の技術及び発明が解決しようとする課題】5-アミノレブリン酸は、テトラピロール化合物のプレカーサとして生体系中の重要な役割を果たしている化合物である。この5-アミノレブリン酸は、除草剤、殺虫剤として優れた効果を示し、しかも人畜に対して毒性を示さず、分解性が高いため環境への残留性もないという優れた性質を有する天然化合物である(特許出願公表61-502814号、特開平2-138201号公報参照)。しかし、この天然の5-アミノレブリン酸は、コストが高く、除草剤や殺虫剤として使用するには実用性に欠ける(Chemical Week/October, 29, 1984)。このような現状において、多くの化学合成方法が検討されている(例えば、特開平2-111747号公報参照)が、未だ充分な方法が開発されていない。

【0003】一方、光合成細菌等の微生物を用いた5-アミノレブリン酸の製造方法も検討されている(特開平2-92293号公報、特願平1-307216号明細書等参照)。5-アミノレブリン酸は、生体系中におい

て、5-アミノレブリン酸デヒドラターゼにより2分子が縮合されてボルフォビリノーゲンとなり、逐次反応して各種のテトラピロール化合物へと代謝される。

【0004】ところで、上記の5-アミノレブリン酸デヒドラターゼは、一般に強い酵素であり、通常は生体系中の5-アミノレブリン酸を速やかに反応させるため、生体系中に5-アミノレブリン酸が蓄積することは稀である。この5-アミノレブリン酸を蓄積させるには、5-アミノレブリン酸デヒドラターゼの活性を弱める必要がある。この手法として、一般には、レブリン酸に代表される5-アミノレブリン酸デヒドラターゼの活性阻害物質を添加する方法が知られている(上記の特開平2-92293号や特願平1-307216号の微生物を用いた5-アミノレブリン酸の製造方法でも、5-アミノレブリン酸デヒドラターゼの活性阻害物質としてレブリン酸が使用されている)。この方法では、添加するレブリン酸等の活性阻害物質のコストがかかる上、5-アミノレブリン酸の蓄積後に、該5-アミノレブリン酸とこれら活性阻害物質とを分離する必要もある。

【0005】一方、光合成細菌は、好気暗条件で培養すると、5-アミノレブリン酸を生成しない。これに対し、現在の実用的な醗酵設備は好気暗条件の培養に設定されている。従って、光合成細菌を使用する5-アミノレブリン酸の製造技術においては、既存の醗酵設備が使用できず、新たな設備あるいは既存の設備の改造を必要とし、5-アミノレブリン酸の製造コストの上昇が必至であった。

【0006】本発明は、以上の諸点を考慮し、5-アミノレブリン酸デヒドラターゼ活性が弱く、しかも嫌気明条件又は好気暗条件において5-アミノレブリン酸を生産することのできる5-アミノレブリン酸生産菌を提案すること、及び5-アミノレブリン酸デヒドラターゼの活性阻害物質の添加を要せず、かつ嫌気明条件、好気暗条件のいずれでも行うことのできる高収率かつ低コストの5-アミノレブリン酸の製造方法を提案することを目的とする。

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記の目的を達成するために研究を重ねた結果、(1)光合成細菌を変異させたものの中に、最小培地で生育が弱く、ボルフォビリノーゲンを添加した最小培地で強い生育を示すものがあり、この菌株が5-アミノレブリン酸デヒドラターゼ活性の弱い菌株であること、また光合成細菌を変異させたものの中に好気暗条件において5-アミノレブリン酸を生産する菌株が存在することを確認し、更に(2)上記の菌株を使用すれば、5-アミノレブリン酸デヒドラターゼ活性阻害物質を添加せずに、あるいは極めて少量の添加により、また好気暗条件に設定された既存の醗酵設備を使用しても5-アミノレブリン酸を高収率で製造できることを確認して、本発明を開発するに至

った。

【0008】すなわち、本発明の5-アミノレブリン酸生産菌は、光合成細菌を変異処理して得られることを特徴とする。また、本発明の5-アミノレブリン酸生産菌は、親株である光合成細菌として、例えば、ロドバクター セファロイデス (*Rhodobacter sphaeroides*) を使用するものである。更に、本発明の5-アミノレブリン酸生産菌は、5-アミノレブリン酸デヒドラターゼ活性の弱い菌株及び好気暗条件又は嫌気明条件で5-アミノレブリン酸を生産することのできる菌株で、その一例として、工業技術院微生物工業技術研究所に微工研第11752号 (FERM P-11752) として寄託されたものが挙げられる。本菌株は、上記2つの性質を同時に持つ変異株の一例である。本発明の5-アミノレブリン酸の製造方法は、5-アミノレブリン酸生産菌を、グリシン及びコハク酸の存在下、嫌気明条件又は好気暗条件下で培養させることを特徴とする。また、本発明の5-アミノレブリン酸の製造方法は、上記の5-アミノレブリン酸生産菌のグロース系のものに限らず、5-アミノレブリン酸生産菌の休止菌体又は菌体由来の酵素を、グリシン及びコハク酸と接触させることをも特徴とする。更に、本発明の5-アミノレブリン酸の製造方法に使用される5-アミノレブリン酸生産菌は、例えば上記した本発明の5-アミノレブリン酸生産菌であることを特徴とする。

【0009】以下、本発明の5-アミノレブリン酸生産菌及び5-アミノレブリン酸の製造方法の詳細を説明する。まず、本発明の5-アミノレブリン酸生産菌は、例えば、光合成細菌であるロドバクター セファロイデスを親株とし、これを変異して得られるものであって、上記のように5-アミノレブリン酸デヒドラターゼ活性が弱く、グリシン及びコハク酸から生産した5-アミノレブリン酸のホルフォビリノーゲンへの転化を極く僅少とし、培養液中に多量の5-アミノレブリン酸を蓄積する。また、本発明の5-アミノレブリン酸生産菌は、嫌気明条件で培養することもできるし、好気暗条件でも培養することができる。このような性質を有する本発明の5-アミノレブリン酸生産菌の分離方法の詳細を以下に例示する。

【0010】上記の親株の増殖に必要な成分を試験管に分注し、滅菌した後、親株を接種し、照射下において静置培養する。この培養液を緩衝液で洗浄した後、変異操作を行う。この変異操作としては、通常の変異手法を採用することができる。例えば、紫外線、電離放射線等の物理的変異原を寒天培地上の親株に照射したり、エチルメタンスルフォネート (EMS)、N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン (NTG)、エチルニトロソ尿素 (ENU) 等のアルキル化剤やプロモデオキシウリジン (BrdUrd) 等の塩基アナログ等の化学的変異原を添加した緩衝液中で親株を培養したり、あ

るいはトランスポゾン変異法等の生物学的変異原を用いる方法がある。このような変異手法によって上記の親株を変異した後、更に緩衝液で洗浄し、寒天培地等に撒き、培養する。

【0011】デヒドラターゼ活性の弱い菌株を効率的に得るには、上記の操作により得られたコロニーを単離し、最小培地で弱い生育を示すか又は全く生育せず、ホルフォビリノーゲンを添加した培地で強い生育を示すことを確認することにより選択することができる。また、好気暗条件でも培養液中に多量の5-アミノレブリン酸を蓄積する株を選択するには、変異株を好気暗条件で培養し、培地中の5-アミノレブリン酸を測定することによって選択することができる。なお、1回の変異で上記の両方の性質を得ることもできるが、どちらか一方の性質しか持たない変異株に、更に変異を施して両方の性質を持たせることもできる。

【0012】このような分離・変異操作に用いる培地には、変異前の親株の場合、変異後の変異菌の場合とも同様のものでよく、グルタミン酸、リンゴ酸、酢酸、ビルビン酸、乳酸、コハク酸、フマル酸、酒石酸、グルコン酸、エタノール、グリセロール、グルコース、フルクトース、マンニトール、ソルビトール、酵母エキス等の炭素源の他に、一般的な培地成分、あるいは通常光合成細菌の培養に用いられる成分が添加される。一般的な培地成分としては、窒素源として、例えばアンモニア、塩化アンモニウム、燐酸アンモニウム、硫酸アンモニウム、炭酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、硝酸アンモニウム、硝酸ナトリウム、尿素等の無機窒素化合物や、酵母エキス、乾燥酵母、ペプトン、肉エキス、コーンステープリカー、カザミノ酸等の有機窒素源を用いることができる。また無機塩類として、例えばカリウム、ナトリウム、鉄、マグネシウム、マンガン、銅、カルシウム、コバルト等の各塩類等を用いることができる。

【0013】また、光合成細菌の培養に通常用いられる成分として、例えば、培地中に存在する鉄やコバルト等の金属を除去し、5-アミノレブリン酸の生成を促進するために、キレート剤を添加することが特に好ましい。このキレート剤としては、例えば、エチレンジアミンテトラ酢酸、シクロヘキサジアンテトラ酢酸、グリコールエーテルジアミンテトラ酢酸、ジエチレントリアミンペンタ酢酸、トリエチレントラミンヘキサ酢酸、ニトリロトリ酢酸、 α 、 α' -ジビリジル等が挙げられる。これらキレート剤の培地への添加量は、培地全体に対し約1~10mmol/l、特に1~4mmol/lが好ましい。添加量が少な過ぎると鉄やコバルト等の金属を充分除去できず、添加量が多過ぎると5-アミノレブリン酸生成の阻害となる。添加方法は、連続的又は断続的添加のいずれでもよい。更に、培養条件としては、親株、変異株ともpH約5~8、温度約15~45℃、時間約1~10日間で、親株の場合は約0.5~50K

luxの光照射嫌気条件下が好ましく、変異株の場合は親株の場合と同様の光照射嫌気条件下あるいは好気暗条件下であっても良い。

【0014】上記の分離・変異操作によって得られる菌株の一例であるCR-17は、親株とはほぼ同様の菌学的性質を有し、かつボルフォビリノーゲン無添加の最小培地では生育が弱く、ボルフォビリノーゲンを添加した培地では生育が強い。そして、グリシンとコハク酸が添加され、5-アミノレブリン酸デヒドラターゼ活性阻害物質が添加されていない培地において、嫌気明条件下又は好気暗条件下で、5-アミノレブリン酸を生成し、多量に蓄積する。このCR-17株は、工業技術院微生物工業技術研究所に寄託されている〔微工研菌寄託第11752号(FERM P-11752)〕。

【0015】次に、本発明の5-アミノレブリン酸の製造方法の詳細を説明する。本発明方法では、上記したCR-17株に代表される本発明の5-アミノレブリン酸生産菌に限らず、他の作出方法によって得られるもの、他の菌を親株として得られるもの、その他の分離方法によって得られる5-アミノレブリン酸デヒドラターゼ活性の弱い、かつ嫌気明条件又は好気暗条件で5-アミノレブリン酸を生産する5-アミノレブリン酸生産菌を使用することができる。なお、好気暗条件においては、5-アミノレブリン酸デヒドラターゼ活性が弱い菌株に限らず、該活性が普通程度の菌株をも使用することができる。これらの5-アミノレブリン酸生産菌を、グリシン及びコハク酸の存在下、嫌気明条件又は好気暗条件下で培養させるか、あるいはこれらの菌体の休止菌体又は菌体由来の酵素を、グリシン及びコハク酸と接触させることにより、5-アミノレブリン酸を製造することができる。

【0016】以下、CR-17株を用いた5-アミノレブリン酸の製造方法を説明する。前述のCR-17株を分離する場合と同様の培地を使用し、同様の培養条件で培養する。このとき、生育を強めるためボルフォビリノーゲンを添加してもよい。また、酵母エキスを加えた複合培地で培養し、集菌したものを使用すれば、培養時間を短縮することができる。更に、培養液のpHを5~8の範囲内で、HCl水溶液又はNaOH水溶液を用いて一定に保つことにより、より高濃度の5-アミノレブリン酸を生成することができる。また、グリシンとコハク酸は、CR-17株の培養開始と同時に添加すると、CR-17株の増殖速度が遅くなるため、或る程度増殖した時点で添加することが好ましい。添加量は、グリシンとコハク酸のいずれの場合も、培地全体に対し、約10~80mmol/l、特に約15~45mmol/lが好ましい。また、添加方法は、一度に全量添加してもよいが、連続的に又は断続的に添加してもよい。

【0017】また、このとき、CR-17の5-アミノレブリン酸デヒドラターゼの活性阻害物質を添加するこ

ともできる。この添加量は、従来の5-アミノレブリン酸の微生物による製造方法の場合の添加量に比し、極く少量でよく、例えばこの阻害物質としてレブリン酸を使用する場合、従来の必要量の1/3程度の量で、従来と同程度の5-アミノレブリン酸の収率を得ることができる。なお、このレブリン酸の添加方法は、CR-17の培養開始時(あるいはグリシンとコハク酸の添加時)から一定の間隔で少量(同量)ずつ添加してもよいし、培養開始時(あるいはグリシンとコハク酸の添加時)に全量を添加しておいてもよい。更に、菌の生育が対数増殖期中期を過ぎた後、添加するとなおよい。このとき、約0.5~50Kluxの光照射嫌気条件としてもよいし、あるいは既存の設備の設定条件である好気暗条件としてもよい。

【0018】上記のCR-17株を休止菌体又は本菌由来の酵素として使用して5-アミノレブリン酸を製造するには、先ず、前述の変異・分離の場合と同様の培地を使用し、同様の培養条件で培養したものをそのまま用いるか、あるいは遠心分離等で菌体分離して用いる。なお、分離した菌体は、更に、磷酸緩衝液等の溶液で洗浄し、該溶液に懸濁させて使用することもできる。また、菌体由来の酵素は、常法により精製したものを使用することが望ましい。すなわち、例えば、上記した菌体の懸濁液を、超音波、フレンチプレス、高圧ホモジナイザ等により破碎処理して得られた菌体破碎物を、遠心分離等により固液分離した後、カラム精製、電気泳動等の一般的精製手段により精製酵素としたものを使用する。更に、これらの休止菌体や菌体由来の酵素は、固定化すると単位体積当たりの酵素量が多くなるため、固定化したものを使用すると、効率良く反応を行うことができる。この固定化は、アルギン酸カルシウム法、ポリアクリルアミドゲル法、ポリウレタン樹脂法、光架橋樹脂法等の常法により行うことができる。

【0019】これらの休止菌体や菌体由来の酵素に、グリシンとコハク酸を、磷酸緩衝液中で接触させると、反応が生じて5-アミノレブリン酸が製造される。このときの反応条件は、前述のCR-17株の変異・分離の場合の条件と同様とするのが好ましい。なお、酵素を使用する場合は、光照射は不要である。この反応において、エネルギー源として、ATP(アデノシン三リン酸)、p_a1-P(ピリドキサルリン酸)、CoA(コエンザイムA)、またメタノール、エタノール、水素、ニコチン酸アミドアデニンジヌクレオチド(NAD)、ホルムアルデヒド、蟻酸等の電子供与体を適宜添加するのが好ましい。なお、この反応においても、5-アミノレブリン酸デヒドラターゼの活性阻害物質を添加することができる。

【0020】以上のようにして得られた培養液又は反応液中の5-アミノレブリン酸は、常法により精製することができる。例えば、溶剤抽出等の方法によって回収す

10

20

30

40

50

ることができ、このときカラムクロマトグラフィ等の公知の精製方法を適宜併用することもできる。

【0021】

【作用】本発明の5-アミノレブリン酸生産菌は、5-アミノレブリン酸デヒドラターゼ活性が弱いため、グリシンとコハク酸から該生産菌の作用によって生成する5-アミノレブリン酸を、ホルフォビリノーゲンにまで転化することができない。このため、本発明の5-アミノレブリン酸生産菌は、本菌の培養液中に、5-アミノレブリン酸を多量に蓄積する作用をなす。また、本発明の5-アミノレブリン酸生産菌は、嫌気明培養条件下ではもとより、好気暗培養条件下においても5-アミノレブリン酸を生産する作用があるため、この菌株によれば、既存の醗酵設備の設定条件である好気暗条件でも5-アミノレブリン酸を蓄積する。

【0022】また、本発明の5-アミノレブリン酸の製造方法では、上記のような作用をなす本発明の5-アミノレブリン酸生産菌をはじめ、他の5-アミノレブリン酸デヒドラターゼ活性の弱い、又は嫌気明条件に限らず好気暗条件でも5-アミノレブリン酸の生産が可能な5-アミノレブリン酸生産菌、あるいはこれらの休止菌体や菌体由来の酵素を使用して、グリシンとコハク酸から5-アミノレブリン酸を製造するため、従来のように、別途、5-アミノレブリン酸デヒドラターゼの活性阻害物質を添加することなく、添加するとしても極く微量を添加するのみで、かつ嫌気明条件、又は既存の醗酵設備の設定条件である好気暗条件で、5-アミノレブリン酸を高収率かつ低コストで製造することができる。

【0023】

【実施例】

実施例1

表1に示すグルタメート・マレート培地の培地成分を、水道水1リットルに溶かして培地1を調製した。培地1のpHは6.8であった。

【0024】

【表1】

化 合 物	組成 (g/l)
グルタミン酸ナトリウム	3.8
リンゴ酸	2.7
KH_2PO_4	0.5
K_2HPO_4	0.5
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	0.8
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2
CaCl_2	5.3×10^{-2}
$\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1.2×10^{-3}
ニコチン酸	1.0×10^{-3}
塩酸チアミン	1.0×10^{-3}
ビオチン	1.0×10^{-5}

【0025】上記の培地1に酵母エキス2g/lを添加して調製した培地2を、外径21mmの試験管に10ml入れ、121℃で15分間滅菌し、光合成細菌であるロドバクター・セファロイデス (*Rhodobacter sphaeroides*) IF012203を1白金耳植え継ぎ、30℃、5Kluxの光照射下で3日間静置培養した。別の試験管に培地2を10ml分注し、滅菌した。これらの培地2に上記の培養液1を3白金耳植え継ぎ、30℃、250rpmで8時間往復振盪培養した。この培養液2を、洗浄のため、15,000rpmにて30秒間遠心分離し、その上清を捨て、遠心分離前の培養液2と同量になるようにトリス・マレイン酸バッファ (pH6.0) に懸濁させた。この洗浄操作を更に2度繰り返した。この後、再び15,000rpmにて30秒間遠心分離し、その上清を捨て、化学的変異原であるN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン (NTG) を100μg/mlの濃度で溶解させた溶液を、もとの(2度目の遠心分離前の)培養液2と等量加え、30℃で80分間静置インキュベートした。

【0026】このようにして処理した菌1を、上記と同様の方法で3回洗浄した後、別の試験管に分注し、滅菌した培地2に植え継ぎ、30℃、250rpmで2日間往復振盪培養した。培地2に寒天17g/lを添加して調製した培地を121℃で15分間滅菌し、同じく滅菌したシャーレに撒いて、寒天平板培地を調製した。このシャーレに、上記の培養液(菌1の培養液)3を滅菌水で1,000倍に希釈して塗布し、30℃で4日間培養した。上記のようにして得られたコロニーのうち、培地1では生育が弱く、培地1にホルフォビリノーゲンを300μmol/l添加した培地1'では強い生育を示す変異菌株を選別した。これらの変異菌株のうちの1つを、ロドバクター セファロイデス CR-17と命名した。

50 【0027】実施例2

実施例1で得られた変異菌株CR-17(微工研菌寄11752号)を、培地1に植え継ぎ、30℃、5Kluxの光照射下で1日間培養した後、トリス塩酸バッファ(pH8.1)で実施例1と同様の方法で菌株を3回洗浄し、超音波破碎により粗酵素液を得た。この粗酵素液の5-アミノレブリン酸デヒドラターゼ(ALAD)活性をSatoらの方法(J. Nutr. Sci. Vitaminol., 27, 439-447, 1981)により測定した。それぞれのALAD活性値を、親株の活性値と共に表2に示す。

【0028】

【表2】

菌株	ALAD活性値 (U/mg蛋白質)
親株	24.8
CR-17	13.4

1U: 30℃, 1時間でボルフォビリノーゲンを1nmol

生成する酵素量

【0029】実施例3

実施例1で得られた変異菌株CR-17(微工研菌寄11752号)を、培地1に接種し、30℃、5Kluxの光照射下で24時間培養した。次いで、グリシンを30mmol/l、コハク酸を30mmol/lとなるように添加し、培養を更に24時間続けた。培養液中の5-アミノレブリン酸をエールリッヒ試薬による発色法により定量したところ、5-アミノレブリン酸が186μmol/l生産されていた。

【0030】実施例4

実施例1で得られた変異菌株CR-17(微工研菌寄11752号)を、培地1で、30℃、5Kluxの光照射下で2日間予備培養した。これを、5-アミノレブリン酸生産培地(グリシン60mmol/l、コハク酸60mmol/l、リンゴ酸2.7g/l、KH₂PO₄・*

*0.5g/l、K₂HPO₄0.5g/l、CaCl₂0.053g/l、pH6.8)に2g/lとなるように接種し、30℃、5Kluxの光照射下で2日間培養した。この結果、5-アミノレブリン酸が522μmol/l生産されていた。

【0031】実施例5

5-アミノレブリン酸生産培地による生産培養を開始し、レブリン酸を培養開始時に5mmol/l、培養開始後1日目に5mmol/l、2日目に5mmol/l添加し、培養期間を3日間とした以外は、実施例4と同様の操作を行った。この結果、5-アミノレブリン酸が8.2mmol/l生産されていた。

【0032】実施例6

実施例1で得られた変異菌株CR-17を培地1に植え継ぎ、30℃、5Kluxの光照射下で1日培養した後、トリス塩酸バッファで実施例1と同様の方法で菌株を3回洗浄し、超音波破碎により1ml当たり0.88mg蛋白質量の粗酵素液を得た。これに、ATP8.5mmol/l、CoA-SH1mmol/l、ピリドキサルリン酸1mmol/l、グリシン0.1mol/l、コハク酸ナトリウム0.1mol/l、塩化マグネシウム10mmol/l、トリス塩酸バッファ50mmol/l、グルタチオン0.3g/lになるように添加し、37℃、2時間インキュベートした。この結果、5-アミノレブリン酸が824μmol/l生産されていた。

【0033】実施例7

実施例1で得られたCR-17と親株を培地1に接種し、30℃の暗条件下で、かつ酸素量とレブリン酸量とを表3に示すようにして培養した。培養開始12時間後に、グリシンを30mmol/l、コハク酸を30mmol/l添加した。なお、レブリン酸の添加時期は培養開始12時間後とした。このときの5-アミノレブリン酸生成量を表3に示す。

【0034】

【表3】

培養条件		5-アミノレブリン酸生成量 (μmol/l)	
培養方法	レブリン酸 (mmol/l)	親株	CR-17
好気暗	0	2	46
好気暗	15	18	108
強制通気暗	15	8	92

【0035】表3から明らかなように、好気暗条件下においても、変異菌株CR-17は、親株に比べ、5-アミノレブリン酸を大量に生成していることが判る。

【0036】

【発明の効果】以上詳述したように、本発明の5-アミノレブリン酸生産菌は、光合成細菌を親株として容易な操作で作出することができる。また、本発明の5-アミノレブリン酸生産菌によれば、グリシンとコハク酸から

5-アミノレブリン酸を生産することができ、しかも5-アミノレブリン酸の2分子を縮合してポルフォピリノーゲンに転化する5-アミノレブリン酸デヒドラターゼの活性が弱いため、培養液中に多量の5-アミノレブリン酸を蓄積することができる。更に、本発明の5-アミノレブリン酸生産菌によれば、嫌気明条件下ではもとより、好気暗条件でも5-アミノレブリン酸を生産することができる。

【0037】そして、本発明の5-アミノレブリン酸の製造方法によれば、上記した本発明の5-アミノレブリン酸生産菌のような5-アミノレブリン酸デヒドラターゼの活性の弱い、かつ嫌気明条件下及び好気暗条件のいずれにおいても5-アミノレブリン酸の生産が可能な5-アミノレブリン酸生産菌あるいは該菌の休止菌体や菌体由来の酵素を使用して、グリシンとコハク酸から高収率で5-アミノレブリン酸を製造することができる。

【0038】このとき、5-アミノレブリン酸デヒドラターゼ活性阻害物質の添加は不要であり、また添加する*

*としても極く微量の添加で充分であるため、本発明の5-アミノレブリン酸の製造方法によれば、製造コストを低減することができる。しかも、5-アミノレブリン酸デヒドラターゼ活性阻害物質を添加しない場合は、5-アミノレブリン酸の製造後に、該5-アミノレブリン酸と5-アミノレブリン酸デヒドラターゼ活性阻害物質の分離工程が不要となり、設備費が低減するばかりでなく、製造効率が大幅に向上し、製造コストを大幅に低減することができる。加えて、好気暗条件で5-アミノレブリン酸の製造ができるため、既存の醗酵設備をそのまま使用して5-アミノレブリン酸の工業的生産ができ、設備コストの大幅な低減を図ることができる。更に、本発明の5-アミノレブリン酸の製造方法によれば、上記の5-アミノレブリン酸生産菌をグロース系で使用することができるため、培養開始時に少量の5-アミノレブリン酸生産菌を使用するのみで、大量の5-アミノレブリン酸を製造することができ、製造コストはより一層低廉となる。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.³

識別記号

弁内整理番号

F I

技術表示箇所

C 1 2 R 1:01)

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-79797

(43) 公開日 平成7年(1995)3月28日

(51) Int.Cl. ⁴	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 P 39/00		9452-4B		
C 0 8 B 37/00	P	7433-4C		
// (C 1 2 P 39/00				
C 1 2 R 1:02				
1:865)				

審査請求 未請求 請求項の数 5 O L (全 8 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平5-230565	(71) 出願人	591183625 フジッコ株式会社 兵庫県神戸市中央区港島中町6丁目13番地 4
(22) 出願日	平成5年(1993)9月16日	(72) 発明者	長野 富士子 兵庫県西宮市天道町24-3
		(72) 発明者	戸田 登志也 兵庫県西宮市大社町2-12-201
		(72) 発明者	奥平 武則 兵庫県神戸市北区惣山町4-6-8
		(74) 代理人	弁理士 角田 嘉宏

(54) 【発明の名称】 可食性ゲルの製造方法

(57) 【要約】

【目的】 ナタと同等の食感を呈する良質の可食性ゲルの製造期間の短縮化、ならびにその生産効率を向上せしめる、可食性ゲルを製造する方法を提供する。

【構成】 培地にセルロース産生能を有する酢酸菌と酵母を同時に植菌、あるいは酵母を前培養した培地に該酢酸菌を追加植菌し、該培地表面に生成した可食性ゲルを回収する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 可食性ゲルの製造方法であって、下記工程、すなわち；

(a) 培地にセルロース産生能を有する酢酸菌と酵母を同時に植菌して、静置培養し、および(b) 前記静置培養の培地表面に生成した可食性ゲルを回収する、ことを特徴とする可食性ゲルの製造方法。

【請求項2】 可食性ゲルの製造方法であって、下記工程、すなわち；

(a) 培地に酵母を植菌して、培養し、(b) 前記酵母の増殖が進んだ前記培地に、セルロース産生能を有する酢酸菌をさらに植菌して、静置培養し、および(c) 前記静置培養の培地表面に生成した可食性ゲルを回収する、ことを特徴とする可食性ゲルの製造方法。

【請求項3】 前記酢酸菌が、*Acetobacter xylinum* FF-88 (FERM BP-4407)である請求項1もしくは2に記載の可食性ゲルの製造方法。

【請求項4】 前記酵母が、サッカロミセス(*Saccharomyces*) 属、およびカンディダ(*Candida*) 属に属する酵母からなるグループから選択された1種以上の酵母である請求項1ないし3のいずれかに記載の可食性ゲルの製造方法。

【請求項5】 前記酵母の植菌数が、前記酢酸菌の植菌数と同等ないし大きい請求項1ないし4のいずれかに記載の可食性ゲルの製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は微生物を利用した可食性ゲルの製造方法、特に、可食性ゲルを産生する酢酸菌に加えて、酵母を併用することを特徴とする、可食性ゲルの製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】従来より、アセトバクター(*Acetobacter*)属に属する酢酸菌によって生成された微生物セルロースを主成分とするゲルとして、フィリピン伝統食品の一つである、ココナツを原料として作られたコンニャク様のゲル状を呈し、独特の食感を有する「ナタ」と称する発酵食品が知られている。

【0003】「ナタ」は原料によっていくつかの種類に分類され、すなわち、「ココナツ」を原料としたものを「ナタデココ」、パイナップルを原料としたものを「ナタデビニャ」とされている。また、工業的に生産される例は少ないものの、他の果実類からでもナタの生産は可能である旨の報告(例えば、Philip. Agric., vol.45, pp.490-516 (1962)を参照のこと)もある。

【0004】そして、ココナツを原料とした場合のセルロースゲルの一般的な製造方法は、まず、ココナツの果肉を擦潰し、この擦潰した果肉を水で抽出して得たミルクあるいはココナツ水に砂糖、リン酸アンモニウム、酢酸等を加え、あらかじめ前培養した酢酸菌を接種して、

約30℃で培養を行う。これにより、培養液表面に酢酸菌の厚い菌膜(ナタ)が生成し、次いで、生成したナタを回収し、付着した培地を洗浄・除去した後、適当な大きさに切断して、シロップ漬にする。この方法により得られたナタは、独特の弾力のあるテクスチャーを呈し、デザート、フルーツカクテル、フルーツサラダなどの材料として使用される。

【0005】このナタを生成する酢酸菌が、アセトバクター・キシリナム(*Acetobacter xylinum*)であることは、すでに明らかにされており(Philip. Agric., vol.51, pp.462-474 (1967); Philip. Jour. Sci., vol.96, pp.91-109 (1967)を参照のこと)、また、生成される菌膜(ナタ)がセルロースを主成分とするものであり(Philip. Agric., vol.51, pp.475-485 (1967))、アセトバクター・キシリナムが菌体外に分泌したセルロースは、網目構造を構成し、その間隙に多量の水分を保持することによってゲル状の外観を呈している。

【0006】また、ナタの研究とは別に、酢酸菌を用いたセルロースの生産については古くから研究が行われており、酢酸菌の分泌するセルロースが、リグニンやヘミセルロースを含まない高純度のセルロースであり、その緻密な網目構造、高弾性、高結晶性、高保水性などの物理的特性が確認されている。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、上述したような独特の食感を有するナタを、わが国において製造するためには、第一にその原料の確保が問題となる。

すなわち、わが国において原料となるココナツの栽培・収穫はされていないため、ナタを生産するためには原料となるココナツを輸入する必要があるため、原料ココナツの輸入・保管における品質管理およびコストに関する負担が必要とされる。

【0008】一方、ココナツやその他の果汁を用いないで微生物セルロースを生産する手段も検討されているが、得られた微生物セルロースの食用への適性については、未だ明らかにされておらず、また、ナタ独特の食感を得るためには生成された可食性セルロース膜に10mm前後の厚みが必要であり、工業的に生産する上で、この所望厚みのゲルを短期間で生成させることが必須課題として挙げられる。

【0009】

【課題を解決するための手段】本発明は、上述した従来技術における課題に鑑みて発明されたものであり、その目的とするところは、原料果実の輸入に依存することなく、ゲル状の可食性微生物セルロースの生産に適した菌株とその培養条件を検討し、該菌株の培養期間の短縮化を図り、それによりナタの生産効率を向上せしめると共に、ナタと同等の食感を呈する良質の可食性微生物セルロースを製造する方法を提供することにある。

【0010】すなわち、本発明者らが、酢酸菌が生成す

るゲル状の可食性微生物セルロースの生産効率を向上させる方法について鋭意検討を重ねた結果、これまで汚染菌と考えられていた酵母と前記酢酸菌を同一培養液にて混在させることにより、その作用機序は明らかではないものの、酢酸菌が産生するゲル状の可食性微生物セルロースの生成が促進されるという全く新しい知見に到達するに至り、すなわち、セルロース生産能を有した酢酸菌と酵母を同時に植菌、あるいは酵母を先に培養した培地（培養液）中にセルロース生産能を有する酢酸菌を追加植菌して、静置培養することによって、所望厚みのナタ

【0011】本発明において適用可能なセルロース生産能を有した酢酸菌は、培養液表面にセルロース厚膜を形成するものであればいずれでも良く、例えば、アセトバクター・キシリナム(*Acetobacter xylinum*)に属する菌株、特に、本発明者らが検索した *Acetobacter xylinum* FF-88の他、*Acetobacter xylinum* (IFO 13693)、*Acetobacter xylinum* (IFO 13773)、*Acetobacter xylinum* (ATCC 10245)、*Acetobacter xylinum* (ATCC 10821)、*Acetobacter xylinum* (ATCC 11142)などの菌株が所望のゲル厚みと食感を有する可食性セルロースゲルを得る上で好ましい。なお、前記 *Acetobacter xylinum* FF-88は、平成5年9月10日に、本願出願人によって、茨城県つくば市東町1丁目1番3号に所在の通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所にて寄託され、受託番号 FERM BP-4407 が付与されている。

【0012】また、本発明の製造方法において使用可能な酵母としては、食品工業界で一般に使用されているものであれば良く、例えば、サッカロミセス・セレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*)、サッカロミセス・ロキシ(*Saccharomyces rouxii*)、サッカロミセス・カールスベルゲンシス(*Saccharomyces carlsbergensis*)、サッカロミセス・ロゼイ(*Saccharomyces rosei*)、カンディダ・モジエ(*Candida damoqii*)、カンディダ・バーサティリス(*Candida versatilis*)などの他、食品工業に使用されるデバリオミセス(*Debaryomyces*)属、ハンゼニウラ(*Hansenula*)属、トルロプシス(*Torulopsis*)属等に属する酵母が使用できる。

【0013】本発明の方法によると、培地表面にセルロース状のゲルが生成される。このゲルは、菌株の特性や培地に用いた栄養源および種々の培養条件等によりその組成に若干の相違が認められるものの、概ね、数パーセントの固形物と残りの大部分を水分が占める。また、この生成されたゲルを2%水酸化ナトリウムで100℃、20分間の条件下で処理して菌体や培地成分を除去した後中和して得られた精製ゲル固形物が、その生成培地の構成・種類が異なっているにもかかわらず、酸加水分解およびセルラーゼで酵素分解した場合、その大部分がグルコース

として検出されることから、ゲルの主成分はセルロースであると考えられる。

【0014】上述したセルロース生産能を有した酢酸菌と酵母を用いてゲル状の可食性微生物セルロースを産生せしめる目的で、炭素源、窒素源、無機塩類、および有機微量栄養素を含んだ通常の栄養培地、および果汁または野菜エキス等を含んだ培地を用いることができる。

この場合、炭素源としては、グルコース、シュクロース、ガラクトース、マンニトール、ソルビトール、マルトース、ラクトース、アラビノース、フルクトース等の糖類が、また、栄養培地における窒素源としては、アミノ酸類、硫酸アンモニウム、硝酸カリウム、酵母エキス、ペプトン等が利用できる。なお、培養温度としては、20℃から40℃、好ましくは25℃から35℃、また、pHは1から8、好ましくは2から6で静置培養をするのが、良好なゲルを得る上で好ましい。

【0015】先に述べてきたように、本発明の製造方法によると、セルロース生産能を有した酢酸菌を用いてゲル状の微生物セルロースを生産せしめるに際して、酵母を同時に、あるいは予め酵母を培養した培養液中に、前記セルロース生産能を有する酢酸菌を植菌して培養を行うものである。

【0016】そして、酢酸菌と酵母を同時植菌する場合は、後述する実施例の試験結果から明らかなように、使用する培地組成によっても多少の差異はあるが、ほぼ同等の菌数、あるいは酵母の菌数を酢酸菌の菌数より大きくして接種するのが望ましい。すなわち、酵母の植菌量が少ない場合は、顕著なゲル生成効果が得られにくいという、後述する実施例の試験結果によるものである。

【0017】また、酵母を先に培養した後に酢酸菌を接種する場合は、使用する酵母に適した培地組成、培地条件で十分な培養が行われた後で、酢酸菌を接種することが良好なゲルを生成させる条件を整備する上で好ましく、さらに、酢酸菌を接種する時点で、酵母により資化されて不足した炭素源、窒素源、その他有機あるいは無機の微量栄養素の補給およびpH調整等を行うことも可能である。なお、酵母の培養日数に関しては特に制限されるものではないが、酵母の十分な生育期間、すなわち、1ないし6日間、特に、1ないし3日間が好ましい。

【0018】酢酸菌は絶対好気性であるため、酵母との混合培養で静置培養を行うと気液界面にゲル状の厚膜微生物セルロースが形成されてくる。9ないし11日間の培養で15mm前後の厚膜ゲルが形成されるが、培養期間としては所望の厚みに達した時点で終了すればよい。このセルロース厚膜は採取された後、通常は流水または繰り返し水さらしを行って付着した培地を除去する。また、必要に応じてアルカリ、酸、有機溶剤、界面活性剤等でさらに洗浄することもできる。このようにして、付着した培地が除去された微生物セルロース厚膜は、糖

液等の調味料に含浸させて、食用に供することができる。

【0019】

【実施例】以下に、本発明の実施例につき説明するが、以下の開示は例示目的のものであり、本発明を限定する旨に解釈すべきではない。

【0020】実施例1

シュクロース10%、酵母エキス0.25%、リン酸一カリウム0.5%、硫酸アンモニウム0.06%、硫酸マグネシウム・7H₂O 0.02%の組成からなる培地 (pH 5.0)300mlを 5 10 00ml容の広口ガラス瓶に入れて、滅菌した。

【0021】上記組成と同じ組成の培地を用いて個別に前培養した 10⁵ 個単位のAcetobacter xylinum FF-88 (FERM BP-4407)、ならびに 10⁵ 個単位のSaccharomyces ce*

* revisiae (IFO 10055)を、先に調製した培地に植菌し、30℃で静置培養を行った。

【0022】同時に対照として、酢酸菌のみを植菌した培地、および酢酸菌と加熱殺菌した酵母の前培養液を加えた培地に関しても培養を行った。

【0023】そして、各試験区に関して、10日間で生成したゲル状物質の厚さ、重量および乾燥物重量を測定し、さらに培養液中の酢酸菌および酵母の生菌数を調べ、その結果を下記表1に示した。なお、ゲル状物質の乾燥物重量は、培地成分が充分除去されるまで水で洗浄した後、105℃で恒量となるまで乾燥した上で求めた。

【0024】

【表1】

使用菌株	ゲル状物質 の厚さ(mm)	ゲル状物質 の重量(g)	ゲル状物質の 乾燥重量(g)
A. xylinum および S. cerevisiae	15	92.8	0.693
A. xylinum のみ	12	72.2	0.549
A. xylinum および 殺菌済 S. cerevisiae	13	79.5	0.598

使用菌株	培養終了後の培地中の生菌数	
	酢酸菌	酵母
A. xylinum および S. cerevisiae	5.5×10 ⁵	3.2×10 ⁶
A. xylinum のみ	7.2×10 ⁵	-----
A. xylinum および 殺菌済 S. cerevisiae	7.6×10 ⁵	-----

【0025】上記表1に示した結果から明らかなように、酢酸菌のみを植菌した試験区よりも酢酸菌と酵母を同時に植菌した試験区において、ゲル生成量の増加が認められた。また、同じ菌数の殺菌済酵母を加えた試験区でもゲル生成量の増加がみられたが、生きた酵母を植菌した場合よりもその増加の幅は小さかった。このことから、酢酸菌と酵母が活動している状態で共存させることにより、顕著なゲル生成量の増大があることが認められた。

【0026】実施例2

実施例1に記載の組成からなる培地 300mlを 500ml容の

広口ガラス瓶に入れ、滅菌し、同じ組成の培地で個別に前培養した 10⁵ 個単位のAcetobacter xylinumFF-88 (FERM BP-4407)と 10⁵ 個単位あるいは 10⁵ 個単位のSaccharomycescerevisiae (IFO 10055)を植菌し、30℃で10日間静置培養を行い、実施例1と同様の項目について測定を行った。

【0027】同時に対照として、酢酸菌のみを植菌した培地に関しても培養を行った。

【0028】そして、その結果を下記表2に示した。

【0029】

【表2】

使用菌株	ゲル状物質 の厚さ(mm)	ゲル状物質 の重量(g)	ゲル状物質の 乾燥重量(g)
A. xylinum および S. cerevisiae ($\times 10^3$)	12	68.3	0.512
A. xylinum および S. cerevisiae ($\times 10^5$)	15	87.6	0.662
A. xylinum のみ	11	66.5	0.453

使用菌株	培養終了後の培地中の生菌数	
	酢酸菌	酵母
A. xylinum および S. cerevisiae ($\times 10^3$)	2.3×10^5	3.1×10^2
A. xylinum および S. cerevisiae ($\times 10^5$)	2.3×10^5	5.2×10^5
A. xylinum のみ	8.1×10^5	-----

【0030】上記表2より、酢酸菌のみを植菌した試験区よりも、酢酸菌と酵母を同時に植菌した試験区のゲル生成量が増大しており、さらに、 10^3 個単位の酵母を植菌した試験区は、 10^5 個単位の酵母を植菌した試験区と比較して、そのゲル生成量の増加の幅が小さいことから、酵母の植菌量を増やすことが、酢酸菌によるゲル産生を促進するものと認められる。

【0031】実施例3

シュクロース10%、酵母エキス0.05%、リン酸一カリウム0.5%、硫酸マグネシウム・ $7H_2O$ 0.05% (pH5.0)の組成からなる培地 300mlを 500ml容の広口ガラス瓶に入れ、滅菌した。上記組成と同組成の培地で個別に前培

養した 10^3 個単位の *Acetobacter xylinum* FF-88 (FERM BP-4407)と、 10^5 個単位の *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces rouxii*, *Candida mogii*、および *Candida milleri* (カンディダ・ミレリ)の各酵母を下記表3に示した組み合わせに従って植菌し、30°Cで静置培養を行い、ゲル厚が10mmに達するのに要した日数を測定した。

30

【0032】同時に対照として、酢酸菌のみを植菌した培地に関しても培養を行った。

【0033】そして、その結果を下記表3に示した。

【0034】

【表3】

使用菌株	所要日数	使用菌株	所要日数
A. xylinum のみ	16	A. xylinum および S. rouxii	11
A. xylinum および S. cerevisiae	11	A. xylinum および S. cerevisiae S. rouxii	10
A. xylinum および C. mogii	10	A. xylinum および S. rouxii C. milleri	10
A. xylinum および S. cerevisiae C. mogii	9	A. xylinum および S. cerevisiae S. rouxii C. milleri	10
A. xylinum および C. milleri C. mogii	9	A. xylinum および S. rouxii C. milleri C. mogii	9
A. xylinum および S. cerevisiae C. milleri C. mogii	10		

使用菌株	所要日数
A. xylinum および C. milleri	11
A. xylinum および S. cerevisiae C. milleri	10
A. xylinum および S. rouxii C. mogii	9
A. xylinum および S. cerevisiae S. rouxii C. mogii	9

【0035】上記表3より、酢酸菌のみを植菌した対照区と比較して、酢酸菌と酵母一種類以上を同時に植菌した各試験区において、ゲル生成期間が短縮できたことが確認された。

【0036】実施例4

シュクロース10%、酵母エキス0.25%、リン酸一カリウム 0.5%、硫酸アンモニウム0.06%、硫酸マグネシウム・7H₂O 0.02% (pH6.0)の組成からなる培地200mlを坂

口フラスコ(500ml容)に入れ、滅菌した。上記培地にポリペプトン、酵母エキス、マルトエキス、およびグルコースを含む培地で前培養したSaccharomyces cerevisiae (IFO 10055)の菌液を植菌し、25℃で、2日間振とう培養を行った。

【0037】この培養液を滅菌した500ml容の広口ガラス瓶に移した後、シュクロース10%、酵母エキス0.25%、リン酸一カリウム 0.5%、硫酸アンモニウム0.06

%, 硫酸マグネシウム・ $7H_2O$ 0.02% (pH6.0)の組成からなる培地で前培養した 10^5 個単位の *Acetobacter xylinum* FF-88 (FERM BP-4407)を植菌し、30℃で、10日間静置培養を行い、実施例1と同様の項目について測定を行った。

【0038】同時に対照として、酢酸菌のみを植菌した*

* 培地、および振とう培養した酵母の培養液を加熱殺菌した後に酢酸菌を植菌した培地に関しても培養を行った。

【0039】そして、その結果を下記表4に示した。

【0040】

【表4】

使用菌株	ゲル状物質の厚さ(mm)	ゲル状物質の重量(g)	ゲル状物質の乾燥重量(g)
A. xylinum および S. cerevisiae	16	98.3	0.731
A. xylinum のみ	12	70.2	0.499
A. xylinum および 殺菌済 S. cerevisiae	13	79.1	0.577

使用菌株	培養終了後の培地中の生菌数	
	酢酸菌	酵母
A. xylinum および S. cerevisiae	2.5×10^5	1.3×10^6
A. xylinum のみ	6.3×10^5	-----
A. xylinum および 殺菌済 S. cerevisiae	5.9×10^5	-----

【0041】表4に示した結果より、酵母を培養した後に酢酸菌を加えて増殖した試験区においては、酢酸菌単独を増殖させた試験区と比較してゲル生成量の増大が認められた。また、実施例1の試験結果と同様に、殺菌した酵母よりも生きた酵母を用いた方が、酢酸菌によるゲル生成能力を促進することが、本実施例の結果から改めて確認された。

【0042】実施例5

上記実施例1～4で得られた各ゲル状物質を、1cm角に切断し、2日間水で洗浄した後、60%シュクロース溶液に入れ、80℃で、30分間殺菌し、室温で3日間放置した※40

30※後に試食した。

【0043】その結果、いずれのゲル状物質も弾力、歯ごたえを備えており、おいしく賞味できた。

【0044】

【発明の効果】本発明により、酢酸菌の可食性セルロースゲル産生能力を酵母の存在およびその相対的量関係により調節することが可能となり、また、満足のゆく食感を備えたゲルの工業的規模での大量生産手段が提供され、産業的に極めて有用な可食性ゲルの製造方法を実現するという作用効果を奏するものである。

【手続補正書】

【提出日】平成6年9月28日

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0031

【補正方法】変更

【補正内容】

【0031】実施例3

シュクロース10%、酵母エキス0.05%、リン酸一カリウム0.5%、硫酸マグネシウム・ $7H_2O$ 0.05% (pH5.0)の組成からなる培地 300mlを 500ml容の広口ガラス瓶に入れ、滅菌した。上記組成と同組成の培地で個別に前培養した 10^5 個単位の *Acetobacter xylinum* FF-88 (FERM BP-4407)と、 10^5 個単位の *Saccharomyces cerevisiae* (IFO 10055)、*Saccharomyces rouxii* (IFO 0320)、*Can*

dida mogii (IFO 0452)、および *Candida versatilis* (カンディダ・バーサティリス: IFO 1228) の各酵母を下記表3に示した組み合わせに従って植菌し、30℃で静置培養を行い、ゲル厚が10mmに達するのに要した日数を測定した。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

*

*【補正対象項目名】0034

【補正方法】変更

【補正内容】

【0034】

【表3】

使用菌株	所要日数	使用菌株	所要日数
<i>A. xylinum</i> のみ	16	<i>A. xylinum</i> および <i>S. rouxii</i>	11
<i>A. xylinum</i> および <i>S. cerevisiae</i>	11	<i>A. xylinum</i> および <i>S. cerevisiae</i> <i>S. rouxii</i>	10
<i>A. xylinum</i> および <i>C. mogii</i>	10	<i>A. xylinum</i> および <i>S. rouxii</i> <i>C. versatilis</i>	10
<i>A. xylinum</i> および <i>S. cerevisiae</i> <i>C. mogii</i>	9	<i>A. xylinum</i> および <i>S. cerevisiae</i> <i>S. rouxii</i> <i>C. versatilis</i>	10
<i>A. xylinum</i> および <i>C. versatilis</i> <i>C. mogii</i>	9	<i>A. xylinum</i> および <i>S. rouxii</i> <i>C. versatilis</i> <i>C. mogii</i>	9
<i>A. xylinum</i> および <i>S. cerevisiae</i> <i>C. versatilis</i> <i>C. mogii</i>	10		

使用菌株	所要日数
<i>A. xylinum</i> および <i>C. versatilis</i>	11
<i>A. xylinum</i> および <i>S. cerevisiae</i> <i>C. versatilis</i>	10
<i>A. xylinum</i> および <i>S. rouxii</i> <i>C. mogii</i>	9
<i>A. xylinum</i> および <i>S. cerevisiae</i> <i>S. rouxii</i> <i>C. mogii</i>	9

フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁶

(C12P 39/00

C12R 1:02

1:85

1:72)

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所